

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÉBORA SCARABOTO

INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO *L72M* DO GENE  
*GHRL* E A OBESIDADE

Curitiba

2013

DÉBORA SCARABOTO

INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO *L72M* DO GENE  
*GHRL* E A OBESIDADE

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado para avaliação da  
disciplina TCC II do curso de  
graduação em Biomedicina, Setor de  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Lupe Furtado Alle

CURITIBA

2013

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

DÉBORA SCARABOTO

### **INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO *L72M* DO GENE *GHRL* E A OBESIDADE**

Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Biomédica no curso de graduação em Biomedicina da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

---

Profa. Doutora Lupe Furtado Alle  
Orientadora – Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná,  
UFPR.

---

Mestre Luciane Viater Tureck  
Doutoranda – Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná,  
UFPR.

---

Doutora Fabiana Antunes de Andrade  
Pós-doutoranda – Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná,  
UFPR.

Curitiba, 12 de dezembro de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Lupe Alle, que esteve sempre disposta a conversar durante horas sobre as minhas dúvidas e resolver os problemas durante o projeto, me apoiando desde o nosso primeiro contato na Iniciação Científica, acompanhando todas as coletas e o decorrer do trabalho e a quem eu respeito muito.

À Carol, que foi muito mais do que uma colega de laboratório, mas uma grande amiga sempre presente para ajudar nas coletas, na bancada, nas análises e que me ensinou muito desde o início da faculdade.

A todo o pessoal do Polimorfismos que me ajudou sempre que precisei e me ensinou praticamente tudo o que eu sei sobre laboratório: ICs, mestrandos, técnicos, doutorandos e professores.

Aos meus pais, por terem me educado de maneira a gostar de ler e aprender, o que foi extremamente útil durante meu projeto.

Aos meus amigos e colegas da faculdade, por terem feito dos meus últimos quatro anos uma época maravilhosa!

*“Felicidade é quando o que você  
pensa, o que você diz e o que você  
faz estão em harmonia.”*

Mahatma Gandhi

## RESUMO

A obesidade caracteriza-se pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo, sendo fundamentada principalmente no desbalanço entre ingestão alimentar e gasto calórico. A prevalência da obesidade tem crescido nos últimos anos, tornando-a um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Devido à importância que esta doença possui é notável a necessidade de identificar os fatores genéticos e ambientais envolvidos em seu desenvolvimento. O gene *GHRL*, localizado no cromossomo 3 humano (3p25-p26), codifica para um peptídeo endógeno de função endócrina chamado grelina, ligante do receptor do secretagogo do hormônio do crescimento (GHS-R) na hipófise. O polimorfismo *Leu72Met* (rs696217) do gene da grelina consiste na troca de uma Citosina por uma Adenina no gene da pré-pró-grelina, o que resulta na substituição de um aminoácido Leucina por uma Metionina na posição 72 do peptídeo produzido e já foi associado à tendência de tornar seus portadores obesos mais cedo que aqueles indivíduos homozigotos para o alelo *72Leu*. O presente trabalho pretende investigar a associação entre o polimorfismo *Leu72Met* do gene *GHRL* e a obesidade em mulheres obesas adultas (IMC>30) (n=133) antes e depois de uma intervenção nutricional para redução de peso. Também foi analisado um grupo controle de 68 mulheres não obesas (IMC<25) para comparação das frequências alélicas com o grupo de mulheres obesas. A extração do DNA para as análises foi feita a partir do lisado de leucócitos por técnica de *salting-out* e a genotipagem dos indivíduos pelo método *TaqMan SNP Genotyping Assay*. No grupo controle a frequência do genótipo *L72L72* foi de 76,47% e do genótipo *L72M72* foi de 23,52%, não sendo encontrado nenhum indivíduo homozigoto para a mutação nessa população. A frequência alélica para o alelo *72Leu* foi de 88,3%±2,75% e a frequência alélica para *72Met* foi de 11,7%±2,75%. Analisando a amostra de obesas foi encontrada uma frequência genotípica de 73,1% para o genótipo *L72L72*, de 23,8% para o genótipo *L72M72*, e de 3,1% para o genótipo *M72M72*. A frequência alélica para *72Leu* foi de 85%±2,2% e para o alelo *72Met* foi de 15%±2,2%. As frequências alélicas foram semelhantes entre os grupos controle e obesas ( $\chi^2 = 1,03$  e  $p = 0,3$ ). Na análise dos exames bioquímicos de 133 mulheres obesas, notou-se um decréscimo nos níveis de HDL depois da intervenção nutricional e aumento dos níveis de glicose no sangue independentemente do genótipo. Nenhuma alteração significativa foi observada quanto aos dados de colesterol total, LDL e triglicerídeos nos indivíduos portadores da mutação. Os níveis de glicose mostraram-se significativamente superiores provavelmente devido ao tempo de jejum prolongado ao qual as participantes foram expostas. As mulheres obesas com genótipo usual (*L72L72*) apresentaram decréscimo nos níveis de colesterol total ao contrário das portadoras do alelo mutante, indicando que a presença do alelo mutante (nos genótipos *L72M72* e *M72M72*) pode ter dificultado a melhoria desse parâmetro bioquímico.

Palavras-chave: Obesidade, grelina, polimorfismo *L72M*.

## ABSTRACT

Obesity is characterized by the excessive accumulation of adipose tissue, being mainly caused by an imbalance between an individual's food intake and calorie expenditure. The prevalence of obesity has seen a recent increase, making obesity one of the major public health concerns worldwide. Due to the importance of this illness, there is a pressing need to identify the genetic and environmental factors involved on its development. One of such factors may be the *GHRL* gene. The *GHRL* gene is located on the human chromosome 3 (3p25-26) and encodes an endogenous peptide with endocrine function called ghrelin, the ligand of the receptor for growth hormone secretagogue (GHS-R). The *Leu72Met* polymorphism (rs696217) of the ghrelin gene consists of a Cytosine to Adenine change in the preproghrelin gene resulting in a Methionine to Leucine substitution on the position 72 of the peptide. The *Leu72Met* polymorphism has been associated with a trend towards earlier obesity among the mutant allele *72Met* carriers than among carriers of the homozygous allele *72Leu*. This study aims to examine the potential association between the *GHRL* polymorphism *Leu72Met* and obesity in adult obese women (IMC>30) (n=133), before and after a nutritional intervention focused on weight loss. A control group composed of 68 non-obese women (IMC<25) has also been analyzed for comparison. The DNA extraction was performed employing the salting-out technique using leukocytes obtained from blood samples. The genotyping was realized using the Taqman SNP Genotyping Assay. In the control group, the genotype frequency of the *L72L72* genotype was 76,47%, compared to 23,52% of the *L72L72M* genotype. No homozygous individual was found among this group to the mutant allele. The allele frequency to *72Leu* was 88,3%±2,75% and to *72Met* 11,7%±2,75%. Among individuals in the obese group, the genotypic frequency of the *L72L72* genotype was 73,1%, to *L72M72* genotype was 23,8% and to *M72M72* genotype the frequency was 3,1%. The allelic frequency of *72Leu* was 85%±2,2% and of *72Met* was 15%±2,2%. The allelic frequencies were similar between the obese and the control group ( $\chi^2 = 1,03$  and  $p = 0,3$ ). Looking at the biochemical exams from obese women, it was noted that their HDL levels dropped after the nutritional intervention and the glucose levels increased, regardless of their genotype. Regarding data on total cholesterol, LDL and triglycerides, there were no significant changes in mutation carriers. Their glucose levels were significantly higher likely due to a prolonged period on an empty stomach which the individuals were exposed to. The group of obese women with the wild genotype showed a decline on total cholesterol levels, in contrast to those carrying the mutant allele. These findings suggest that the presence of the mutant allele (genotype *L72M72* and *M72M72*) could have hampered the decrease in cholesterol levels among obese women.

Keywords: Obesity, ghrelin, *L72M* polymorphism.





## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS PARA A MUTAÇÃO <i>Leu72Met</i> NOS GRUPOS CONTROLE E OBESAS .....	<b>17</b>
<b>TABELA 2</b> – DADOS BIOQUÍMICOS DAS MULHERES OBESAS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL .....	<b>18</b>
<b>TABELA 3</b> - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NOS INDIVÍDUOS NÃO PORTADORES DO ALELO <i>72Met</i> .....	<b>19</b>
<b>TABELA 4</b> – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NOS INDIVÍDUOS PORTADORES DO ALELO <i>72Met</i> .....	<b>20</b>
<b>TABELA 5</b> – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ANTES DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA EM NÃO PORTADORES E PORTADORES DO ALELO <i>72Met</i> .....	<b>21</b>
<b>TABELA 6</b> – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA EM NÃO PORTADORES E PORTADORES DO ALELO <i>72Met</i> .....	<b>21</b>
<b>TABELA 7</b> – DADOS ANTROPOMÉTRICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NAS PARTICIPANTES OBESAS .....	<b>22</b>
<b>TABELA 8</b> – PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL EM NÃO PORTADORES DO ALELO <i>72Met</i> .....	<b>23</b>
<b>TABELA 9</b> – DADOS ANTROPOMÉTRICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL EM PORTADORAS DO ALELO <i>72Met</i> .....	<b>24</b>
<b>TABELA 10</b> – DADOS ANTROPOMÉTRICOS ANTES DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA EM NÃO PORTADORES E PORTADORES DO ALELO <i>72Met</i> .....	<b>25</b>
<b>TABELA 11</b> – DADOS ANTROPOMÉTRICOS DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA EM NÃO PORTADORES E PORTADORES DO ALELO <i>72Met</i> .....	<b>25</b>

## SUMÁRIO

<b>1 OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
1.1 OBJETIVO GERAL .....	1
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	1
<b>2 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
3.1 OBESIDADE .....	4
3.2 EPIDEMIOLOGIA DA OBESIDADE .....	5
3.3 NUTRIÇÃO E OBESIDADE .....	6
3.4 GENÉTICA E OBESIDADE.....	7
3.5 GRELINA .....	8
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>11</b>
4.1 AMOSTRAS .....	11
4.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	11
4.1.2 CRITÉRIOS ÉTICOS.....	11
4.1.3 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES.....	12
4.2 DESENHO DO ESTUDO .....	12
4.3 DETALHAMENTO DA INTERVENÇÃO .....	13
4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS, ANTROPOMÉTRICAS E GENÉTICAS.....	13
4.4.1 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E ANTROPOMÉTRICOS.....	13
4.4.2 EXTRAÇÃO DE DNA .....	14
4.4.3 GENOTIPAGEM .....	15
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a associação entre o polimorfismo *Leu72Met* do gene da grelina humana com a obesidade em mulheres.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Calcular e comparar a frequência do polimorfismo *Leu72Met* em amostras de mulheres obesas e não obesas;
- Correlacionar a presença do polimorfismo genético com variáveis antropométricas (peso, altura, IMC, circunferência da cintura e circunferência do quadril) e bioquímicas (colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicerídeos e glicemia) em mulheres obesas submetidas a uma intervenção dietética.

## 2 INTRODUÇÃO

A obesidade caracteriza-se pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo que pode gerar diversas consequências negativas à saúde (WHO, 2013).

O diagnóstico da obesidade pode ser feito através do cálculo do índice de massa corporal (IMC) que classifica os indivíduos em normais e com excesso de peso – seja sobrepeso ou obesidade. É definido pelo peso do indivíduo em quilogramas dividido pela sua estatura em metros ao quadrado. A definição da Organização Mundial da Saúde é de que níveis de IMC entre 25 e 29,9 enquadram o indivíduo na categoria de sobrepeso, e níveis de IMC superior a 30 caracterizam obesidade (WHO, 2013).

Diversas comorbidades são associadas à obesidade, entre elas as doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, desordens musculares (como osteoartrites), alguns tipos de câncer, entre outras (WHO, 2013). É uma desordem crônica de diversas origens, ainda que a mais importante seja o desequilíbrio entre o gasto energético e a ingestão alimentar (NIH, 1998). Dentre as diversas causas, a nutrição e as características genéticas têm significativa relevância para o desenvolvimento da obesidade (BLAKEMORE & FROGUEL, 2008).

A grelina é produzida por células endócrinas no estômago e age no cérebro aumentando a ingestão alimentar e o peso corporal (UCHIDA, *et al.*, 2013). Esse hormônio também está associado à diminuição do metabolismo energético e aumento do tecido adiposo. Tschöp *et al.*, (2000) já demonstraram que a grelina causa ganho de peso devido à diminuição do uso de lipídios, e que seus níveis séricos aumentam no jejum e diminuem após ingestão alimentar.

O gene *GHRL* fica localizado no cromossomo 3 (3p25-p26) (SMITH *et al.*, 1997) e é constituído por 518 pb que codificam uma sequência de 117 aminoácidos formando a pré-pró-grelina (KOJIMA *et al.*, 1999). Esta, ao ser clivada no estômago gera a grelina, um peptídeo endógeno de função endócrina com 28 aminoácidos (KOJIMA *et al.*, 1999), ligante do receptor do secretagogo do hormônio do crescimento (GHS-R) na hipófise (SMITH *et al.*, 1996).

Ukkola *et al.* (2001) já relacionam os portadores do alelo mutante (genótipos *L72M72* e *M72M72*), que resulta em uma alteração do aminoácido Leucina pelo

aminoácido Metionina na posição 72 da molécula da pré-pró-grelina, com a tendência de se tornarem obesos mais cedo que os homozigotos para o alelo selvagem 72L. A presença do variante L72M já foi associada a um aumento da prevalência da Síndrome Metabólica, bem como a maiores concentrações de glicemia de jejum, menores concentrações de HDL (lipoproteína de alta densidade) e níveis mais elevados de triglicerídeos (STEINLE *et al.*, 2005).

Com base em estudos anteriores, o objetivo deste trabalho é buscar associação entre a presença do alelo mutante 72Met do gene *GHRL* e a obesidade e analisar sua influência na resposta de mulheres obesas participantes de uma intervenção nutricional por meio da avaliação de parâmetros bioquímicos (glicemia, colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos) e antropométricos (peso, altura, circunferência da cintura e circunferência abdominal) antes e após a intervenção. Para isso, foi realizada a genotipagem de amostras das voluntárias obesas e a frequência alélica obtida foi comparada com uma população de indivíduos controle (adultos não obesos do sexo feminino).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 OBESIDADE

A obesidade é uma condição caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de tecido adiposo. É uma doença multifatorial com uma heterogeneidade considerável, sendo um dos principais componentes da Síndrome Metabólica e um fator de risco para diabetes tipo 2 e hipertensão, além de facilitar a morte prematura por complicações derivadas de doenças cardiovasculares (FRAYN, 1992). Por ser uma desordem multifatorial, a etiologia da obesidade é de origem complexa, sendo determinada por fatores genéticos e ambientais que interagem entre si. Sendo assim, é possível afirmar que o aumento mundial da prevalência de obesidade pode ser atribuído às mudanças nos estilos de vida incidindo sobre fatores de predisposição ou susceptibilidade genética para se tornar obeso (MARQUES-LOPES, 2004).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde o Índice de Massa Corporal (IMC) é um índice simples que relaciona peso e altura e que é normalmente usado para classificar as variações de sobrepeso e obesidade em adultos. É definido pelo peso do indivíduo em quilogramas dividido por sua altura em metros ao quadrado ( $\text{kg/m}^2$ ) (WHO, 2013). A Organização Mundial da Saúde classifica os indivíduos com IMC maior ou igual a 25 e menor que 29,9 como tendo sobrepeso, e IMC maior ou igual a 30 como sendo obesos. O IMC é a medida de sobrepeso e obesidade mais útil para classificar a população, já que o cálculo é o mesmo para ambos os sexos e para os adultos de todas as idades. Contudo, deve ser considerado como uma aproximação, já que não indica o mesmo grau de acúmulo de gordura em diferentes indivíduos com IMC semelhante (WHO, 2013).

BARNESS *et al.* (2007) estudaram os aspectos genéticos, moleculares e ambientais da obesidade, encontrando inúmeras complicações causadas por essa doença, incluindo hipertensão, disfunções endoteliais, esteatose hepática, entre outras. Ao investigar o papel dos fatores genéticos e ambientais na variação do peso corporal comparado com a altura (dados obtidos com o cálculo do índice de massa

corporal), MOLL *et al.* (1991) concluíram que cerca de 75% da variação populacional de IMC pode ser explicada por fatores genéticos.

### 3.1.1 EPIDEMIOLOGIA DA OBESIDADE

O sobrepeso e a obesidade são os responsáveis pelo quinto maior número de mortes no mundo. Além disso, 44% dos casos de diabetes e 23% dos casos de doenças isquêmicas do coração podem ser atribuídos ao excesso de peso. Ainda, cerca de 2,8 milhões de adultos morrem a cada ano por consequências do excesso de peso e 65% da população mundial vive em países onde o sobrepeso e a obesidade matam mais do que a desnutrição (WHO, 2013).

Dados de 2008 da Organização Mundial da Saúde indicam que cerca de 1,4 bilhões de adultos (maiores de 20 anos) no mundo tinham sobrepeso, sendo que destes, mais de 200 milhões de homens e 300 milhões de mulheres eram obesos, o que engloba mais de 10% da população adulta mundial (WHO, 2013). De acordo com dados da Seção de Antropometria e Estado Nutricional da Pesquisa de Orçamentos Familiares (2008-2009) feita pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 16,4% das mulheres brasileiras são obesas, sendo que a maior prevalência de obesidade foi encontrada nas regiões Sul (18,6%) e Sudeste (16,8%) (IBGE, 2010).

De maneira geral cerca de 23% da população mundial estava com sobrepeso no ano de 2005 e 9,8% era obesa (7,7% dos homens e 11,9% das mulheres). Em número, isso representa 937 milhões de indivíduos com sobrepeso e 396 milhões de obesos no mundo (KELLY *et al.*, 2008). Kelly *et al.* (2008) fizeram um estudo epidemiológico para calcular como estarão os dados de obesidade e sobrepeso em 2030. De acordo com o estudo, cerca de 1,35 bilhões de pessoas estarão com sobrepeso e cerca de 573 milhões de indivíduos serão obesos.

### 3.1.2 NUTRIÇÃO E OBESIDADE

Vários fatores afetam um indivíduo na determinação de seu consumo alimentar. Sistemas internos individuais associados a fatores externos refletem no acesso, seleção e consumo de alimentos. Fatores de ordem fisiológica podem interferir na nutrição do indivíduo, ou seja, no aproveitamento metabólico dos nutrientes após a ingestão. Porém, a falta de sincronia entre ingestão alimentar e gasto de energia é um dos principais fatores de risco para instalação da obesidade (NIH, 1998; IBGE, 2010).

ERIKSSON *et al.* (1991) *apud* Curso de atualização em Nutrição Química, UNIFESP (2006) testaram as consequências de uma intervenção nutricional e aplicação de exercícios físicos a longo prazo. Eles realizaram um estudo na Suíça que envolveu 256 participantes diabéticos ou com intolerância à glicose. Os resultados mostraram que aqueles pacientes expostos à intervenção nutricional e com exercícios (n=200) apresentaram redução de peso, melhora da sensibilidade à insulina e de outros parâmetros bioquímicos. Concluíram que a intervenção nutricional e de exercícios é eficaz para redução de peso e melhora dos exames bioquímicos, mesmo em um grande grupo de pacientes testados, o que pode ser extrapolado para pacientes com sobrepeso e obesidade.

LEMIEUX *et al.* (1994) *apud* Curso de atualização em Nutrição Química, UNIFESP (2006) afirmaram que a restrição de energia ingerida pode auxiliar na diminuição da gordura corporal e no metabolismo de carboidratos em pacientes obesos, além de ajudar a retardar a progressão do diabetes tipo 2. Este estudo também sugeriu que a diminuição da energia total pode ser obtida com o decréscimo no consumo de lipídeos na dieta, o que pode levar à perda de gordura corporal, mais especificamente gordura visceral (concentrada no abdome), um efeito benéfico da redução de gorduras na dieta.

Além dos fatores que parecem óbvios no desenvolvimento da obesidade, como influência da alimentação e dos exercícios físicos, alguns elementos devem ser considerados. Entre eles, diferentes condições às quais o indivíduo foi exposto *in útero*, determinadas substâncias poluentes que mimetizam hormônios e fatores epigenéticos podem influenciar no desenvolvimento da obesidade (RIGBY, 2013).



### 3.1.3 GENÉTICA E OBESIDADE

A obesidade é uma doença complexa, sendo que suas formas comuns são poligênicas e multifatoriais (MARQUES-LOPES *et al.*, 2004). Há diferentes interações entre os genes relacionados a essa doença e o ambiente. Sendo assim, a pressão ambiental pode exceder a capacidade de adaptação homeostática em pessoas geneticamente predispostas, levando a um desequilíbrio energético e favorecendo a estocagem de gordura (FROGUEL *et al.*, 2000, apud BOBERG D, 2008).

Considera-se que aproximadamente 70% da variação de adiposidade entre diferentes indivíduos se deve a fatores genéticos, e que pessoas com maiores riscos genéticos de desenvolver a obesidade são mais suscetíveis aos efeitos ambientais essenciais para o desencadeamento da doença (BLAKEMORE & FROGUEL, 2008).

Através do sequenciamento de genes que codificam para enzimas ou transportadores relacionados com a obesidade, foi possível identificar polimorfismos que podem estar associados a essa doença. A pesquisa em nutrição e genética até o presente momento apontou alguns genes e seus polimorfismos que podem afetar a propensão a desenvolver a obesidade (ELLIOT *et al.*, 2007). Indivíduos portadores de determinados alelos de genes envolvidos no metabolismo energético poderiam ter uma predisposição maior ou menor para o ganho de peso dependendo do polimorfismo em questão, sendo que, a habilidade para perder peso induzida por uma dieta hipocalórica parece ser influenciada pelo genótipo (MARTI *et al.*, 2006).

Diversos estudos com genes candidatos associados à obesidade e seus fenótipos associados já foram realizados, incluindo os genes do receptor 4 de melanocortina, adiponectina, leptina, receptores beta-adrenérgicos 2 e 3 e de alguns neurotransmissores (BLAKEMORE & FROGUEL, 2008). Alguns polimorfismos comuns do gene do receptor do secretagogo do hormônio do crescimento (*GHS-R*), ligante da grelina, já foram associados com a obesidade (BAESSLER *et al.*, 2005), entre eles o polimorfismo *Leu72Met*.

### 3.2 GRELINA

A grelina é um hormônio peptídico produzido principalmente por células da mucosa do estômago (DATE *et al.*, 2000). É um ligante endógeno para o receptor do secretagogo do hormônio do crescimento (GHS-R), que estimula a secreção do hormônio do crescimento (GH) a partir da hipófise. A grelina funciona transmitindo sinais de fome para o cérebro, estimulando o apetite, a motilidade intestinal, o metabolismo da glicose e outras funções metabólicas (CHEN *et al.*, 2009). Análises imunohistoquímicas indicaram que os neurônios que contêm grelina são encontrados no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo, uma região envolvida na regulação do apetite (LU *et al.*, 2001).

CAIXAS *et al.* (2001) *apud* HOŮBYE C. (2003) mostraram que a alimentação diminui os níveis plasmáticos de grelina. As concentrações séricas de grelina oscilam em humanos, alcançando seu ponto mais baixo logo após uma refeição e aumentando com o tempo até a próxima refeição, sendo esse fato coerente com a regulação do apetite que esse hormônio provoca (CUMMINGS *et al.*, 2001).

TSCHÖP *et al.* (2000) demonstraram que a administração periférica e diária de grelina causou aumento de peso por reduzir o metabolismo dos lipídeos em ratos. A administração intracerebroventricular de grelina gerou um aumento dose-dependente na ingestão alimentar e no peso corporal. Além disso, as concentrações séricas de grelina aumentaram em jejum e diminuíram quando houve alimentação ou administração oral de glicose, mas não mudaram com ingestão de água. Dessa maneira, esses autores propuseram que a grelina, além de ter papel na secreção do GH, sinaliza ao hipotálamo quando um aumento na eficiência metabólica se faz necessário. NAKAZATO *et al.* (2001) também demonstraram que a grelina é envolvida na regulação hipotalâmica da homeostase energética. Injeções intracerebroventriculares de grelina estimularam significativamente a alimentação em ratos, e aumentaram seu ganho de peso.

O gene *GHRL* (3p26-p25) codifica a pré-pró-grelina, um peptídeo precursor da grelina composto por 117 aminoácidos. Este gene codifica a pré-pró-grelina, um peptídeo precursor da grelina composto por 117 aminoácidos. Este peptídeo, após sofrer clivagem, formará a pró-grelina de 94 aminoácidos. A partir de um processamento pós-traducional na pró-grelina são formados dois peptídeos: a

grelina, com 28 aminoácidos e outro peptídeo com 23 aminoácidos, com um resíduo de glicina na cauda C-terminal (ZHANG *et al.*, 2005). ZHANG *et al.* (2005) nomearam esse peptídeo de ação oposta à da grelina como obestatina, derivado do latim “*obedere*” que significa “devorar, consumir” e “*statin*”, que significa “supressão”.

Ao estudar mutações no gene da grelina que possivelmente influenciam o comportamento alimentar e o risco para síndrome metabólica, obesidade e diabetes, STEINLE *et al.* (2005) genotiparam 856 amostras para 3 polimorfismos do gene em questão. Entre eles, estudaram o polimorfismo *Leu72Met*. Essa variante fica fora da região onde o produto da grelina é codificado e sua importância funcional ainda é desconhecida (LIAO *et al.* 2013). O polimorfismo mostrou-se associado a uma alta prevalência de Síndrome Metabólica, assim como a maiores índices de ingestão de glicose, baixas taxas de lipoproteínas de alta densidade (HDL) ( $p=0,007$ ) e altos níveis de triglicerídeos ( $p=0,04$ ).

O polimorfismo *Leu72Met* consiste na troca de uma Citosina por uma Adenina na posição 408 do gene da grelina, resultando na transição de um aminoácido Leucina por uma Metionina na posição 72 da molécula da pré-pró-grelina (BERTHOLD *et al.*, 2009).

Ukkola *et al.* (2001) observaram uma tendência em obesos portadores do alelo *72Met* de adquirirem a obesidade mais cedo do que os obesos homozigotos para o alelo selvagem *72Leu*. Essa é uma das características mais estudadas do polimorfismo em questão.

Korbonits *et al.* (2002) estudaram o gene da grelina em um grupo de 70 crianças obesas. Eles analisaram 10 SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único – “*single-nucleotide polymorphism*”), entre eles o polimorfismo *Leu72Met*, que foi associado a crianças com médias maiores de IMC e com menor secreção de insulina durante a primeira parte de um teste oral de tolerância à glicose, embora nenhuma diferença nos níveis de glicose no sangue tenha sido notada. Os autores concluíram que as variações no gene que codifica para a grelina, contribuem com a obesidade em crianças e podem modular a secreção de insulina induzida por glicose.

Larsen *et al.* (2005) não encontraram diferença nas frequências alélicas do polimorfismo *Leu72Met* entre um grupo de obesos e um grupo controle de indivíduos

não obesos. Também não encontraram associação do polimorfismo com o IMC, níveis de lipídeos no sangue, glicose ou insulina.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 AMOSTRAS**

Participaram do estudo 300 mulheres obesas, de origem caucasiana residentes em Curitiba (Paraná) e região metropolitana. Foram colhidas amostras de sangue (antes e depois da intervenção dietética aplicada) daqueles indivíduos que compareceram ao convite para participação na pesquisa, que atenderam os critérios de inclusão e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Devido a desistências por parte das voluntárias e problemas durante o estudo, o número de amostras a ser genotipadas foi reduzido para 133.

Para o grupo controle, foram selecionadas amostras de sangue de 74 mulheres adultas euro-brasileiras com IMC considerado normal (entre 19 e 24,9), do biobanco disponível no laboratório onde as análises de genotipagem foram realizadas.

#### **4.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Foram considerados os seguintes critérios de inclusão: idade maior ou igual a 20 anos, sexo feminino, ser portadora de obesidade grau I ou II, ter saúde aparente e estar na pré-menopausa.

Foram tomados como critérios de exclusão: ser fumante, estar em tratamento dietoterápico ou medicamentoso para redução de peso, ser portadora de doença crônica não controlada, de diabetes tipo I, de hipotireoidismo, ou doença renal crônica, ser gestante ou lactante.

#### **4.1.2 CRITÉRIOS ÉTICOS**

A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e da Pontifícia Universidade

Católica do Paraná (PUCPR). Participaram da pesquisa os indivíduos que leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

#### 4.1.3 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

Para seleção de voluntárias, foi feita divulgação na mídia local, em hospitais e na Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba sobre a possibilidade de participação na pesquisa. Os indivíduos que compareceram no dia marcado foram reunidos em local reservado e apropriado localizado nas dependências da PUCPR para palestra explicativa, seleção dos indivíduos qualificados para o estudo e esclarecimento de dúvidas. Os indivíduos interessados e que atenderam aos critérios de inclusão e os critérios éticos foram convidados a participar da pesquisa. Os indivíduos não incluídos por opção ou devido aos critérios de exclusão foram encaminhados a fazer acompanhamento nutricional gratuito na Clínica de Nutrição da PUCPR.

#### 4.2 DESENHO DO ESTUDO

Durante dois dias foi realizada a seleção de um grupo de voluntárias do sexo feminino que se enquadraram nos critérios de inclusão, sendo todas classificadas como obesas ( $IMC > 30$ ). Foi feita uma coleta de sangue de todas as voluntárias obesas para a avaliação dos parâmetros bioquímicos analisados. Nesta mesma oportunidade foram obtidos também os parâmetros antropométricos das voluntárias.

Durante oito semanas foi aplicada uma intervenção nutricional formulada por nutricionistas e alunos do curso de Nutrição da PUCPR em todas as voluntárias obesas. Todas tiveram amostras de sangue genotipadas para pesquisa do polimorfismo *Leu72Met*. As frequências alélicas obtidas foram comparadas com as de um grupo de indivíduos do sexo feminino com  $IMC < 25$  selecionados em um biobanco do Laboratório de Polimorfismos e Ligação da UFPR. Esse grupo foi denominado grupo controle (indivíduos do sexo feminino não obesos).

Após a genotipagem de todos os indivíduos para o polimorfismo analisado, foi feita uma comparação entre os parâmetros bioquímicos dos participantes obesos

antes e depois da aplicação da orientação dietética, subdividindo os resultados entre os grupos de portadores e não portadores do alelo mutante *72M*.

#### 4.3 DETALHAMENTO DA INTERVENÇÃO

Os indivíduos receberam atendimento nutricional individualizado, que abrangeu a avaliação do consumo alimentar, orientação dietética e orientação sobre o consumo do substituto de refeição. Para tais orientações, foi desenvolvido um protocolo de intervenção a partir de evidências científicas para controle de peso. A orientação dietética individualizada foi realizada no atendimento nutricional pré e pós-intervenção.

A dieta individualizada foi formulada por nutricionistas e alunos do curso de Nutrição da PUCPR, a partir da ingestão calórica usual obtida do recordatório alimentar de 24h comparada com o cálculo da necessidade energética estimada. A coleta de sangue para análises bioquímicas foi feita pré-intervenção e na 8ª semana pós-intervenção dietética.

#### 4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS, ANTROPOMÉTRICAS E GENÉTICAS

##### 4.4.1 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E ANTROPOMÉTRICOS

Foram feitas duas coletas de sangue para a realização dos exames bioquímicos (colesterol total, LDL, HDL, triglicerídeos e glicemia de jejum), sendo utilizados os valores de referência do Laboratório de Análises Clínicas da PUCPR onde os exames foram feitos. O colesterol total é calculado através da fórmula:  $\text{Colesterol Total} = \text{LDL} + \text{HDL} + (\text{Triglicerídeos}/5)$ . Todos os parâmetros bioquímicos foram mensurados na unidade mg/dL.

O peso e a altura das participantes foram medidos com auxílio de fita métrica e balança, e a partir deles foi calculado o Índice de massa corporal de cada voluntária através do cálculo:  $\text{IMC} = \text{peso(kg)}/\text{altura(m}^2\text{)}$ . Foram obtidas também as

medidas da circunferência da cintura, circunferência abdominal, peso e estatura de todas as voluntárias. O parâmetro “estatura” foi mensurado apenas para calcular o Índice de Massa Corporal, não sendo, por esse motivo, seus dados individualmente utilizados nas análises finais.

#### 4.4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Esta técnica consiste na separação, a partir do sangue periférico, do creme de leucócitos de onde será extraído o DNA. Foram coletados 10 mL de sangue em um tubo com anticoagulante EDTA de cada voluntária, por ser o aditivo que melhor conserva a amostra biológica para extração do DNA. Esse material foi centrifugado a 2500 rpm por 20 minutos para separação do creme de leucócitos, que se apresenta como uma camada mais clara, facilmente visível, e que será utilizada na extração do DNA.

Acrescido de alguns mL da suspensão de eritrócitos, o material foi estocado a -20°C. Após o descongelamento deste material, o creme de leucócitos sofreu resuspensão em 10 mL de TKM1 (Tris-HCl 0,01 M pH 7,6; KCl 0,01 M; MgCl<sub>2</sub> 0,01 M; EDTA 0,002M), uma solução utilizada para solubilizar a membrana das células e foram acrescentados 125 µL do detergente IGEPAL® CA-630 (Sigma-Aldrich) na intenção de lisar os leucócitos para liberar o DNA. Após centrifugar as amostras a 2500 rpm por 20 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o volume dentro do tubo novamente foi completado até a marca de 10 mL com TKM1. A centrifugação e a ressuspensão em TKM1 foram repetidas até que o sobrenadante ficou bem claro. Depois da última centrifugação e desprezo do sobrenadante, ressuspendeu-se delicadamente o precipitado com micropipeta de 1000 µL, adicionando 800 µL de TKM2 (Tris-HCl 0,01 M pH7,6; KCl 0,01 M; MgCl<sub>2</sub> 0,01 M; EDTA 0,002 M; NaCl 0,4 M). A mistura foi agitada manualmente e então a solução foi transferida para um tubo de 1,5 mL. Adicionou-se 50 µL de SDS 10% e os reagentes foram misturados. O resultante foi encubado em banho-maria a 55°C em período *overnight*, na intenção de homogeneizar a amostra. No outro dia, as amostras foram retiradas do banho-maria e 300 µL de NaCl saturado (6 M) foram adicionados, misturando bem. As amostras foram então levadas à centrifuga a 1200 rpm por 20 minutos, para que



as proteínas ficassem no precipitado e o DNA no sobrenadante. Este sobrenadante foi então transferido para um tubo de ensaio e foram adicionados dois volumes de etanol 100%, gelado, em relação ao volume de solução no tubo. Cada tubo foi tampado com PARAFILM® (Sigma-Aldrich) e foi realizado o movimento de inversão do tubo várias vezes (delicadamente) até precipitar o DNA. O DNA se apresenta na forma de uma “nuvem” branca no interior do tubo. Para “pescá-lo” foi utilizada uma micropipeta de 1000 µL com ponteira de ponta cortada e o material obtido foi colocado em um novo tubo de 1,5 mL devidamente identificado com o nome da amostra. O tubo foi mantido semi-aberto na estufa a 37°C, até evaporar todo o álcool que pudesse ter ficado junto no tubo. Finalmente, o DNA foi resuspenso em 200 µL de tampão TE (Tris HCl pH8,0 0,01 M e EDTA pH 8,0 0,001 M) e os tubos ficaram no banho-maria a 55°C por cerca de 2 dias. No caso de o produto final não ter sido prontamente utilizado, foi estocado a -20°C até o uso.

#### 4.4.3 GENOTIPAGEM

Após a extração de DNA das amostras controle e amostras de indivíduos obesos, foi determinada a concentração de DNA em cada amostra, com auxílio do espectrofotômetro NanoDrop™ 2000. Todas as amostras foram diluídas com água deionizada purificada até chegar à concentração de 20ng/µL.

A genotipagem foi realizada pelo método *Taqman SNP Genotyping Assay* com uso do aparelho Mastercycler Realplex 2 da Eppendorf, localizado na Unidade de Sequenciamento e Análise de DNA – SEAD (Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas). Foi utilizado o Kit de Genotipagem *TaqMan SNP* (Applied Biosystems). Esse *kit* é composto por 2 oligonucleotídeos iniciadores específicos não marcados (*primers*) e duas sondas, que consistem de oligonucleotídeos específicos para cada alelo, marcados com diferentes fluorescências, como por exemplo: VIC, emitindo coloração vermelha sinalizará Alelo A e FAM com a coloração verde sinalizará Alelo B. Há também um terceiro fluoróforo no *kit*, neste caso: ROX, usado pelo equipamento como referência passiva de fluorescência. Para a identificação dos alelos presentes no SNP estudado para cada indivíduo da amostra, foi utilizado o seguinte protocolo: preparo de um mix de reação e posterior

aplicação em diferentes poços, cada um contendo previamente 2 µL do DNA correspondente a cada voluntária. Cada amostra foi somada a: 4 µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix*, 4,2 µL de água ultra-pura e 0,3 µL do *primer* específico, obtendo um volume total de 10,5 µL.

O uso do aparelho para este protocolo de genotipagem é realizado em três etapas. A primeira é a chamada pré-leitura, na qual é lida a fluorescência basal da placa antes do processo de amplificação. A segunda é a amplificação em si, realizada para todos os segmentos dentro dos seguintes padrões de PCR: primeiro passo de 2 minutos a 50°C; segundo passo de 10 minutos a 95°C; terceiro passo repetido 45 vezes de 15 segundos a 95°C intercalados por 1 minuto a 62°C e o quarto passo de 2 minutos a 60°C, o chamado “End Point”. A terceira etapa é a chamada “pós-leitura”, que se resume à análise dos dados gerados antes, durante e após a amplificação, resultando no genótipo de cada indivíduo analisado e sua plotagem em um gráfico.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de genotipagem, análises bioquímicas e análises antropométricas foram lançados no programa Microsoft Excel e posteriormente, para os cálculos de frequências, médias, variâncias e teste-t foi utilizado o Software *Statistica for Windows*. Para os cálculos de qui-quadrado foi utilizado o programa *Clump*.

## 5 RESULTADOS

Por meio da genotipagem (*Taqman SNP Genotyping Assay*) do grupo controle e do grupo de obesas, verificou-se que ambos os grupos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (grupo controle  $\chi^2=1,19$  e grupo obesas  $\chi^2=0,26$  com valor de  $p=0,03$ ). A tabela abaixo mostra o resultado da genotipagem de 133 obesas e 68 controles, mostrando a frequência genotípica para o genótipo homozigoto selvagem (L72L72), heterozigoto (L72M72) e homozigoto para a mutação (M72M72) em ambos os grupos (TABELA 1):

TABELA 1 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS PARA A MUTAÇÃO *Leu72Met* NOS GRUPOS CONTROLE E OBESAS

	L72L72 (n=149)	L72M72 (n=48)	M72M72 (n=4)
Controle	76,47% (n=52)	23,52% (n=16)	0% (n=0)
Obesas	73,1% (n=97)	23,8% (n=32)	3,1% (n=4)

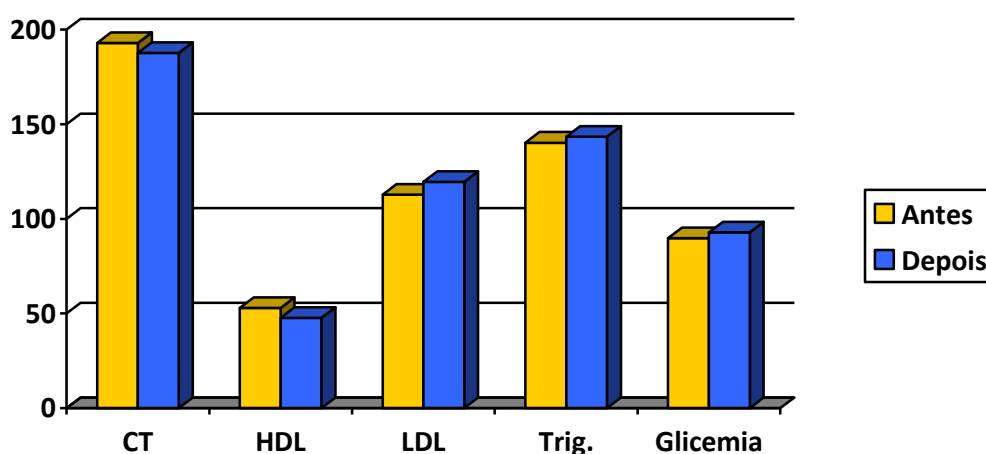
A frequência alélica no grupo controle para Leu foi de  $88,3\% \pm 2,75\%$  e para Met foi de  $11,7\% \pm 2,75\%$ . Já no grupo de obesas para Leu foi de  $85\% \pm 2,2\%$  e para Met foi de  $15\% \pm 2,2\%$ . O teste de qui-quadrado foi aplicado para comparar as frequências alélicas das duas populações, e ambas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2=1,03$  e  $p=0,3$ ).

A análise genotípica forneceu base para a avaliação dos dados bioquímicos. A tabela (TABELA 2) e o gráfico abaixo (GRÁFICO 1) mostram a comparação dos parâmetros bioquímicos (colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos e glicemia) em 123 obesas participantes da pesquisa, independentemente do genótipo, antes e depois da intervenção dietética de 60 dias. Os valores de  $p$  assinalados com “\*” são significativos estatisticamente ( $p$  significativo  $<0,05$ ).

TABELA 2 – DADOS BIOQUÍMICOS DAS MULHERES OBESAS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL

Parâmetro Bioquímico	Antes da intervenção	Depois da intervenção	<i>p</i>	<i>T</i>
Colesterol Total(mg/dL)	192,9403	187,7537	0,0044445*	2,894
HDL (mg/dL)	52,29104	47,6791	3,527E-14*	8,493
LDL (mg/dL)	112,697	119,597	0,0003263*	-3,695
Triglicerídeos (mg/dL)	140,2463	143,2985	0,4436202	-0,768
Glicemia (mg/dL)	89,74627	92,8209	0,0058762*	-2,79975

GRÁFICO 1 – NÍVEIS SÉRICOS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL EM TODAS AS PARTICIPANTES OBESAS DA PESQUISA.



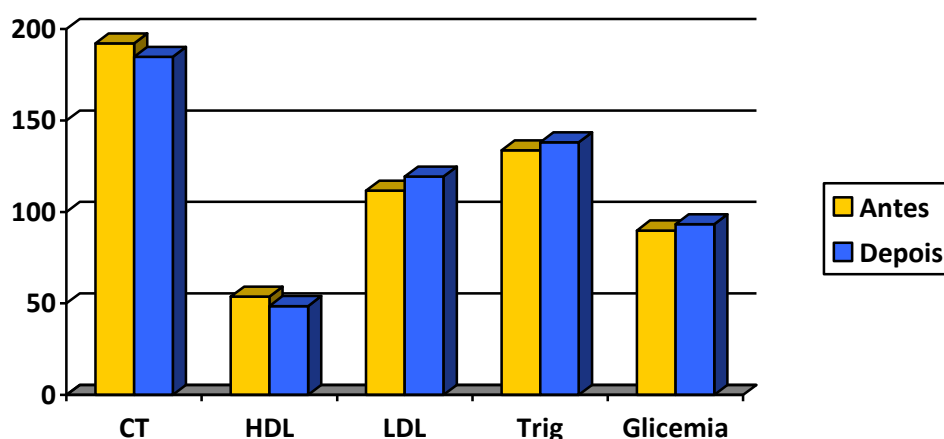
A tabela (TABELA 3) e o gráfico (GRÁFICO 2) a seguir mostram a comparação entre os parâmetros bioquímicos: colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos e glicemia de jejum (em mg/dL) entre os indivíduos não portadores do alelo mutante *72Met*, antes e depois da intervenção dietética de 60 dias. Os valores

de  $p$  assinalados com “ \* ” são significativos estatisticamente ( $p$  significativo  $<0,05$ ).

TABELA 3 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NOS INDIVÍDUOS NÃO PORTADORES DO ALELO *72Met*

Parâmetro Bioquímico	Antes da intervenção	Depois da intervenção	$p$	$t$
Colesterol Total (mg/dL)	192,107	184,774	0,0023*	3,147
HDL (mg/dL)	53,714	48,5595	8,911E-11*	7,426
LDL (mg/dL)	111,655	119,338	0,00195*	-3,199
Triglicerídeos (mg/dL)	133,690	138,024	0,389	-0,866
Glicemia (mg/dL)	89,845	93,286	0,0429*	-2,057

GRÁFICO 2 – NÍVEIS SÉRICOS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NAS OBESAS NÃO PORTADORAS DO ALELO *72Met*

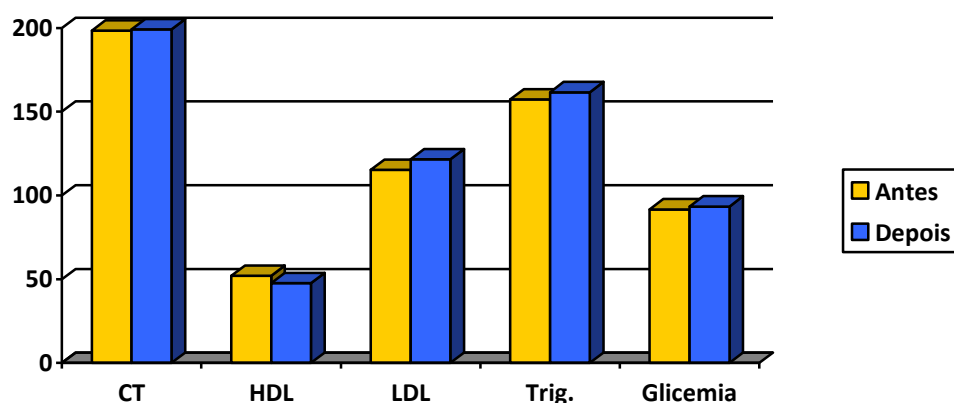


A tabela (TABELA 4) e o gráfico a seguir (GRÁFICO 3) mostram a comparação entre os parâmetros bioquímicos nas mulheres obesas portadoras do alelo *72Met* antes e depois da intervenção nutricional. Os valores de  $p$  assinalados com “ \* ” são significativos estatisticamente ( $p$  significativo  $<0,05$ ).

TABELA 4 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NOS INDIVÍDUOS PORTADORES DO ALELO *72Met*

Parâmetro Bioquímico		Antes da intervenção	Depois da intervenção	<i>p</i>	<i>t</i>
Colesterol	Total	198,3571429	199,2142857	0,847920363	-0,193623024
	(mg/dL)				
HDL (mg/dL)		52,10714286	47,67857143	0,001393756*	3,561589268
LDL (mg/dL)		115,2642857	121,6	0,166136891	-1,423180317
Triglicerídeos (mg/dL)		157,25	161,6071429	0,650347789	-0,458379883
Glicemia(mg/dL)		91,71428571	93,42857143	0,220411986	-1,254500096

GRÁFICO 3 - NÍVEIS SÉRICOS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NAS OBESAS PORTADORAS DO ALELO *72Met*



A tabela a seguir (TABELA 5) expõe a comparação dos parâmetros bioquímicos antes da intervenção dietética entre todos os indivíduos obesos participantes da pesquisa, dividindo-os entre portadores e não portadores do alelo mutante *72Met*.

TABELA 5 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ANTES DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA EM NÃO PORTADORES E PORTADORES DO ALELO *72Met*

Parâmetro Bioquímico		Não Portadores	Portadores	<i>p</i>	<i>t</i>
Colesterol (mg/dL)	Total	192,107	198,357	0,465	-0,732597419
	HDL (mg/dL)	53,714	52,107	0,567	0,573513927
LDL (mg/dL)		111,655	115,264	0,604	-0,520592193
	Triglicerídeos (mg/dL)	133,690	157,25	0,170	-1,737311061
Glicemia(mg/dL)		89,845	91,714	0,569	-0,404469069

A tabela a seguir (TABELA 6) compara os parâmetros bioquímicos entre os indivíduos portadores e não portadores do alelo *72Met* depois da intervenção dietética de 60 dias.

TABELA 6 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA EM NÃO PORTADORES E PORTADORES DO ALELO *72Met*

Parâmetro Bioquímico		Não Portadores	Portadores	<i>p</i>	<i>t</i>
Colesterol (mg/dL)	Total	184,774	199,214	0,064	-1,872520887
	HDL (mg/dL)	48,559	47,678	0,721	0,3575279
LDL (mg/dL)		119,338	121,6	0,761	-0,304174142
	Triglicerídeos (mg/dL)	138,024	161,607	0,153	-1,436629466
Glicemia (mg/dL)		93,286	93,428	0,968	-0,028311326

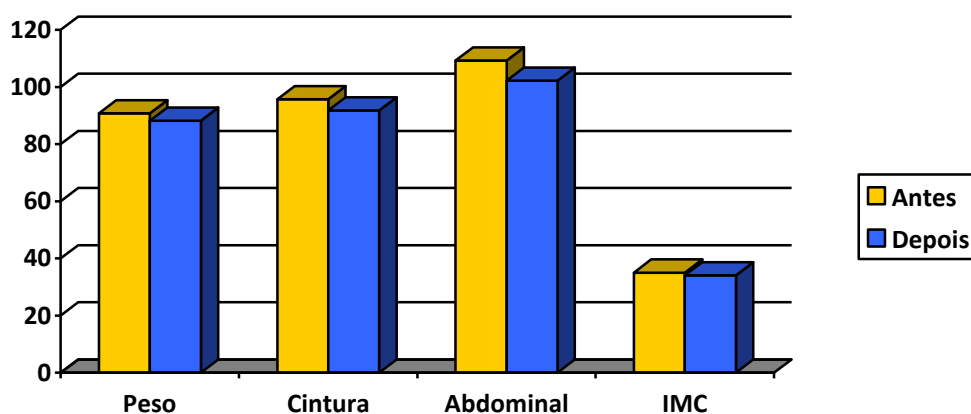
Quanto aos dados antropométricos (peso, altura, circunferência da cintura, circunferência abdominal e IMC) os resultados constam nas tabelas e gráficos a

seguir. No gráfico (GRÁFICO 4) e na tabela (TABELA 7) a seguir é possível observar os dados antropométricos peso (em kg), circunferência da cintura em centímetros (Cintura), circunferência abdominal em centímetros (Abdominal) e IMC antes e depois da intervenção na média das participantes da pesquisa (independentemente do genótipo). Os valores de  $p$  assinalados com “ \* ” são significativos estatisticamente ( $p$  significativo  $<0,05$ ). O número de indivíduos aos quais os dados se referem é 123.

TABELA 7 – DADOS ANTROPOMÉTRICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NAS PARTICIPANTES OBESAS

Parâmetro Antropométrico	Antes	Depois	$p$	$t$
Peso (kg)	90,7625	88,183	3,038E-20*	10,861
Circunferência da cintura (cm)	95,792	91,755	3,10215E-24*	12,416
Circunferência abdominal (cm)	109,227	102,1935	0,0001*	15,495
IMC	35,020	34,015	4,091E-20*	10,811

GRÁFICO 4 – DADOS ANTROPOMÉTRICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NAS PARTICIPANTES OBESAS



A tabela (TABELA 8) e o gráfico (GRÁFICO 5) a seguir mostram a

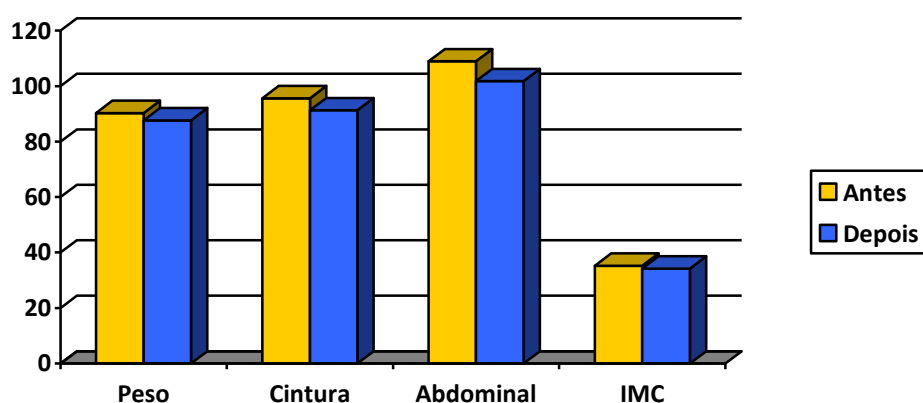


comparação entre os dados antropométricos peso (em kg), circunferência da cintura em centímetros (Cintura), circunferência abdominal em centímetros (Abdominal) e IMC antes e depois da intervenção nutricional dos indivíduos não portadores do alelo mutante *72Met*.

TABELA 8 – PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL EM NÃO PORTADORES DO ALELO *72Met*

Parâmetro Antropométrico	Antes	Depois	<i>p</i>	<i>t</i>
Peso (kg)	90,307	87,649	2,567E-12*	8,155
Circunferência da cintura (cm)	95,6275	91,254	1,08E-16*	10,309
Circunferência abdominal (cm)	108,940	101,773	4,047E-23*	13,587
IMC	35,227	34,186	2,38E-12*	8,171

GRÁFICO 5 – PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL EM NÃO PORTADORAS DO ALELO *72Met*



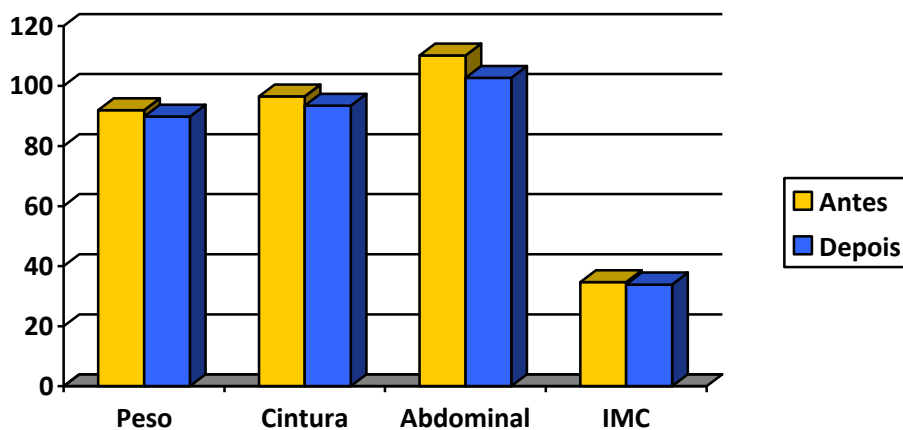
A tabela (TABELA 9) e o gráfico (GRÁFICO 6) a seguir fornecem a comparação dos dados antropométricos antes e depois da intervenção dietética nos indivíduos portadores do alelo *72Met*. Os valores de *p* assinalados com “\*” são

significativos estatisticamente ( $p$  significativo  $<0,05$ ).

TABELA 9 – DADOS ANTROPOMÉTRICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL EM PORTADORAS DO ALELO *72Met*

Parâmetro Antropométrico	Antes	Depois	$p$	$t$
Peso (kg)	91,936	89,816	3,53355E-07*	6,553
Circunferência da cintura (cm)	96,252	93,436	0,00025*	4,169
Circunferência abdominal (cm)	110,179	102,696	2,123E-06*	5,895
IMC	34,7115	33,885	5,599E-07*	6,383

GRÁFICO 6 - DADOS ANTROPOMÉTRICOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NAS OBESAS PORTADORAS DO ALELO *72Met*



A tabela 10 compara os dados antropométricos antes da intervenção dietética entre os indivíduos não portadores e os portadores do alelo *72Met*.

TABELA 10 – DADOS ANTROPOMÉTRICOS ANTES DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA EM NÃO PORTADORES E PORTADORES DO ALELO *72Met*

Parâmetro Antropométrico	Não portadores	Portadores	<i>p</i>	<i>t</i>
Peso (kg)	90,417	91,937	0,627	-0,487
Circunferência da cintura (cm)	95,6275	96,252	0,776	-0,285
Circunferência abdominal (cm)	108,940	110,179	0,603	-0,521
IMC	35,227	34,7115	0,648	0,457

A tabela 11 compara os dados antropométricos depois da intervenção dietética entre os indivíduos não portadores e os portadores do alelo mutante *L72M*.

TABELA 11 – DADOS ANTROPOMÉTRICOS DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA EM NÃO PORTADORES E PORTADORES DO ALELO *72Met*

Parâmetro Antropométrico	Não portadores	Portadores	<i>p</i>	<i>t</i>
Peso (kg)	88,01235	89,817	0,573	-0,565
Circunferência da cintura (cm)	91,462	93,437	0,417	-0,815
Circunferência abdominal (cm)	102,088	102,697	0,795	-0,26
IMC	34,186	33,885	0,792	0,265

## 6 DISCUSSÃO

No grupo controle a frequência genotípica de indivíduos homozigotos para o alelo selvagem (genótipo L72/L72) foi de 76,47%. A frequência genotípica de indivíduos heterozigotos foi de 23,52%, e não foi encontrado nenhum indivíduo homozigoto para a mutação *Leu72Met* nessa população. A frequência alélica para Leu foi de 88,3%±2,75% e para Met foi de 11,7%±2,75%.

No grupo de obesos a frequência genotípica de indivíduos homozigotos para o tipo selvagem (L72/L72) foi de 73,1%, de indivíduos heterozigotos foi de 23,8%, e a frequência de indivíduos homozigotos para a mutação foi de 3,1%. A frequência alélica para Leu foi de 85%±2,2% e para Met foi de 15%±2,2%.

Através da análise estatística, pode-se perceber que as frequências alélicas são semelhantes entre os grupos controle e obesos ( $\chi^2 = 1,03$  e  $p = 0,3$ ). Isso indica que não houve predominância do polimorfismo estudado no grupo de obesos. Esses resultados são condizentes com os estudos de UKKOLA *et al.* (2001) e de DANTAS (2008) que também não encontraram diferenças na frequência alélica entre grupos controle e de obesos.

Através da análise dos dados da Tabela 2 e do Gráfico 1, é possível perceber que o colesterol total diminuiu em média em todos os participantes da pesquisa após a intervenção dietética. Como indivíduos que consomem grandes quantidades de gordura, geralmente apresentam colesterol sérico mais elevado, a diminuição do colesterol total era um resultado já previsto nas participantes da pesquisa, tendo em conta que a dieta aplicada orientava as participantes a diminuir seu consumo de gorduras, evitando alimentar-se de frituras, margarina, maionese e derivados de leites integrais. Os níveis de HDL diminuíram depois da intervenção. Isso pode ser explicado devido ao baixo consumo de carboidratos aconselhado na dieta. FRANCO *et al.* (2009) fizeram um estudo envolvendo atividade física e alimentação, e usaram como modelo de estudo roedores. Eles perceberam que o aumento nos níveis de HDL só aconteceu naqueles animais que fizeram dieta e exercícios físicos, não tendo diferença significativa nos animais que fizeram apenas dieta. Considerando que a dieta fornecida às participantes obesas da presente pesquisa induzia baixo consumo de carboidratos, a diminuição do HDL pode ser

devido ao uso de aminoácidos para formar intermediários no Ciclo de Krebs, já que a disponibilidade de carboidratos era baixa. O uso de aminoácidos favorece a formação excessiva de amônio, produto que colabora com a fadiga e leva à diminuição da oxidação de substratos energéticos. Dessa maneira, é possível inferir que as participantes não realizaram exercícios físicos durante o período de intervenção dietética, dificultando a elevação nos níveis de HDL. A queda nos níveis de HDL concorda com resultados apresentados por THOMPSON *et al.* (1979) que indicaram diminuição do HDL nas primeiras semanas de intervenção nutricional, acompanhando a diminuição do peso.

Os níveis de triglicerídeos não tiveram alteração significativa, e a explicação também pode ser o fato de as participantes não realizarem exercícios físicos, o que ajudaria a diminuir os níveis de triglicerídeos séricos. Os níveis de LDL aumentaram significativamente nos dados gerais. Estudos indicam que isso ocorre devido à baixa ingestão de carboidratos na dieta (KRAUSS *et al.*, 2006). Dessa maneira, as partículas de LDL ficam maiores e mais densas. Isso provoca um aumento nas taxas do exame, que mede o “peso” de LDL no sangue (medido em mg/dL). Os dados dos pacientes continuaram dentro dos valores desejáveis para LDL (<130mg/dL).

Já a glicemia teve um aumento significativo. Isso pode ser explicado devido ao tempo prolongado de jejum à que as participantes foram expostas na primeira fase de coleta de sangue (antes da intervenção nutricional). Todas as participantes foram orientadas a fazer jejum de 8 horas, mas devido a problemas com falta de profissionais, a maioria das participantes foi atendida depois do horário marcado, prolongando seu tempo de jejum. Na segunda etapa de coleta (depois da intervenção) todas as participantes tiveram tempo de jejum efetivo de cerca de 8 horas. Como o organismo usou glicose como fonte de energia enquanto não havia ingestão de alimentos, na primeira etapa da coleta a glicemia das participantes mostrou-se muito baixa quando comparada com a segunda etapa.

Avaliando a Tabela 3 e a ilustração do gráfico 2, pode-se notar que o colesterol total diminuiu significativamente nos indivíduos não portadores da mutação, comparando-se os dados de antes e depois da intervenção nutricional, o que já era esperado com base na dieta aplicada. Houve diminuição significativa dos níveis de HDL e aumento das taxas de triglicerídeos, ambos sendo explicado pela ausência de exercícios físicos. Também ocorreu aumento nos níveis de LDL, o que

pode ser explicado pelo aumento no tamanho das partículas decorrente da baixa ingestão de carboidratos.

Na tabela 4 e no gráfico 3 é possível perceber que não houve diminuição do colesterol total nos indivíduos portadores da mutação, ao contrário do que aconteceu nos indivíduos não portadores, quando comparados os dados de antes e depois da intervenção nutricional. Isso indica que a mutação pode estar relacionada à menor diminuição deste parâmetro bioquímico, já que a dieta aplicada nos dois grupos foi basicamente a mesma. Esse foi um dos mais importantes achados do presente estudo.

A diminuição do HDL nos indivíduos portadores também pode ser explicada pela falta de exercícios físicos. Os outros parâmetros bioquímicos não apresentaram alterações significativas.

Não foi possível perceber nenhuma diferença significativa entre os portadores da mutação e os não portadores antes da intervenção nutricional na tabela 5, contrariando o que indicam estudos anteriores (STEINLE *et al.*, 2005) que associam maiores níveis de triglicerídeos e menores níveis de HDL aos portadores do alelo mutante 72Met. Da mesma maneira, quando se analisa a Tabela 6, nota-se que não houve nenhuma diferença significativa nesses dados depois da intervenção nutricional. Ao analisar o colesterol total, é possível perceber que seus níveis tendem a ser maiores nas portadoras da mutação, pois o “p” é ligeiramente maior que 0,05, ou seja, se a amostra fosse maior, “p” poderia ser significativo. Isso se complementa com a teoria anteriormente apresentada que indica que os portadores da mutação teriam maior dificuldade em reduzir seu colesterol total.

A análise da tabela 7 e do gráfico 4 nos fornece uma visão sobre as mudanças nos parâmetros antropométricos das participantes antes e depois da intervenção nutricional, independentemente do seu genótipo. É possível observar que peso, circunferência da cintura, circunferência abdominal e IMC diminuíram significativamente, demonstrando que a intervenção dietética foi eficaz na média de todas as participantes. Ainda assim, a redução do peso não foi suficiente para excluí-las do perfil “Obeso” caracterizado por IMC>30. Da mesma maneira, a circunferência da cintura continuou em um valor alto (>88cm).

Na tabela 8 e no gráfico 5 é possível perceber que todos os parâmetros (peso, circunferência da cintura, circunferência abdominal e IMC) sofreram redução

significativa depois da intervenção nutricional em indivíduos não portadores da mutação, o que é esperado em intervenções com déficit calórico. Porém, a diminuição de IMC não foi suficiente para excluí-las da classificação “obesos”. Provavelmente, se a avaliação fosse feita depois de um período de dieta mais prolongado, seus dados antropométricos diminuiriam ainda mais.

A tabela 9 e o gráfico 6 fornecem dados antropométricos antes e depois da intervenção dietética apenas nos indivíduos portadores da mutação *L72M*. Nota-se que elas tiveram redução de peso e consequentemente do IMC, assim como redução da circunferência abdominal e da cintura. Isso se explica pelo fato de a obesidade ser uma doença multifatorial e estar associada a interferentes ambientais, como a dieta, nesse caso. Dessa maneira, é possível afirmar que a dieta foi eficaz na perda de peso, independentemente do genótipo.

Analisando a tabela 10 é possível perceber que não havia diferença significativa em nenhum dado antropométrico antes da intervenção dietética quando comparados os grupos de não portadores e portadores da mutação. Esse fato discorda dos dados de Takezawa *et al.* (2013) que observaram maior IMC e maior circunferência da cintura em mulheres portadoras do alelo *72Met*. Por outro lado, o mesmo estudo indicou que mulheres homozigotas para o alelo mutante *72Met* apresentaram menores níveis de ingestão alimentar, indicando que elas teriam menos fome do que as heterozigotas ou homozigotas para o alelo selvagem *72Leu*, o que poderia contribuir para que seu IMC fique estatisticamente semelhante ao do grupo controle no presente estudo.

Como ambos os grupos eram de mulheres obesas, é esperado que alguns dos dados avaliados fiquem acima dos níveis-padrão. A tabela 11 comparou os dados antropométricos depois da intervenção dietética entre portadores e não portadores da mutação *Leu72Met*. Observa-se que nenhuma diferença entre esses dados foi significativa, ou seja, a mutação não influenciou na alteração dos parâmetros antropométricos após a intervenção nutricional. O presente estudo não encontrou nenhuma associação entre a mutação *Leu72Met* e o IMC em obesos antes ou depois da intervenção dietética (tabelas 10 e 11). Esse resultado condiz com resultados de estudos anteriores feitos por DANTAS (2008) e UKKOLA *et al.* (2001).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste trabalho foi investigar possíveis associações do polimorfismo *Leu72Met* com a obesidade em um grupo de mulheres selecionadas na cidade de Curitiba. Baseando-se em estudos anteriores, esperava-se que a presença do alelo mutante *72Met* estivesse relacionada com determinados parâmetros alterados, como maiores níveis de triglicerídeos e menores níveis de colesterol HDL. Além disso, assim como em outros estudos, não foi encontrada associação do alelo *72Met* com maiores níveis de IMC.

Apesar de o alelo mutante estudado não ter sido associado com maiores indicadores antropométricos neste estudo, pode-se dizer que determinados parâmetros bioquímicos analisados foram significativos. Em linhas gerais, pode-se concluir que a principal associação observada neste estudo acerca da presença do alelo mutante *72Met* em mulheres obesas, é o fato de este alelo provocar dificuldades na melhoria do colesterol total após a aplicação de uma dieta. Provavelmente porque a dieta aplicada teve uma duração curta, os demais parâmetros bioquímicos e antropométricos analisados não demonstraram resultados significativos após a intervenção nutricional.

Durante o processo de coleta das amostras e análise dos resultados, o principal obstáculo foi a alteração na glicemia das voluntárias, causadas devido a uma diferença brusca no tempo de jejum de cada coleta. Devido a isso, os dados relacionados aos níveis de glicose não foram considerados nas análises dos resultados.

A realização do projeto contribuiu significativamente para a formação acadêmica da autora, sendo a vivência em laboratório e em grupo, o comprometimento e a responsabilidade exigidos, fatores importantes nesse processo.



## REFERÊNCIAS

BAESSLER, A.; HASINOFF, MJ.; FISCHER, M.; REINHARD, W.; SONNENBERG, GE.; OLIVIER, M.; ERDMANN, J.; SCHUNKERT, H.; DOERING, A.; JACOB, HJ.; COMUZZIE, AG.; KISSEBAH, AH.; KWITEK, AE. Genetic Linkage and Association of the Growth Hormone Secretagogue Receptor (Ghrelin Receptor) Gene in Human Obesity. **Diabetes**, v. 51, p. 259-267, 2005.

BARNESS LA.; OPITZ JM.; GILBERT-BARNESS E. Obesity: Genetic, molecular, and environmental aspects. **American Journal of Medical Genetics Part A** 143, p.3016–3034, 2007.

BERTHOLD, HK.; GIANNAKIDOU, E.; KRONE, W.; MANTZOROS, CS.; GOUNI-BERTHOLD, I. The Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene is associated with a decreased risk for type 2 diabetes. **Clinica Chimica Acta**, v.399, p.112-116, 2009.

BLAKEMORE, AIF.; FROGUEL, P. Is obesity our genetic legacy? **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93(11), p. S51–S56 Supplement Review, 2008.

CAIXAS A.; BASHORE C.; TRAUSE A.; PI-SUNYER FX.; LAFERRERE B. Feeding acutely suppresses ghrelin levels in normal weight human subjects. **Obesity Research** v. 9, 2001. *In*: HOÏBYE C.; BARKELING B.; ESPELUND U.; PETERSSON M.; THORÉN M. Peptides associated with hyperphagia in adults with Prader–Willi syndrome before and during GH treatment. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 13 p. 322–327, 2003.

CHEN, C.; ASAKAWA, A.; FUJIMIYA, M.; LEE, S.; INUI, A. Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. **Pharmacological Reviews**, v.61, p.430-481, 2009.

CUMMINGS, DE.; PURNELL, JQ.; FRAYO, RS.; SCHMIDOVA, K.; WISSE, BE.; WEIGLE, DS. A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans. **Diabetes**, v.50, p. 1714-1719, 2001.

DANTAS, VGL. Estudo de associação de variações dos genes BCHE (butirilcolinesterase) e GHRL (grelina) com obesidade. **Dissertação de mestrado**. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

---

DATE, Y.; KOJIMA M.; HOSODA H.; SAWAGUCHI A.; MONDAL MS.; SUGANUMA T.; MATSUKURA S.; KANGAWA K.; NAKAZATO M. Ghrelin, a Novel Growth Hormone-Releasing Acylated Peptide, Is Synthesized in a Distinct Endocrine Cell Type in the Gastrointestinal Tracts of Rats and Humans. **Endocrinology**, v.141, n.11, p. 4255-4261, 2000.

ELLIOT RM.; JOHNSON IT. Nutrigenomic approaches for obesity research. **Obesity Reviews**, v.8(1), p. 77-81, 2007.

ERIKSSON KF.; LINDGÄRDE F. Prevention of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise. The 6-year Malmö feasibility study. **Diabetologia**, v. 34 (12), p. 891-898, 1991. In CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM NUTRIÇÃO QUÍMICA. **Nutrição na Obesidade**. UNIFESP/EPM, 2006.

FRANCO, GP.; SCALA, LC.; ALVES, CJ.; FRANÇA, GV.; CASSANELLI, T.; JARDIM, PC. Metabolic syndrome in patients with high blood pressure in Cuiabá-Mato Grosso State: prevalence and associated factors. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 92(6), P.437-442, 2009.

FRAYN, KN.; COPPACK, SW. Insulin resistance, adipose tissue and coronary heart disease. **Clinical Science**, v. 82, p. 1-8, 1992.

FROGUEL P.; GUY-GRAND B.; CLEMENT K. Genetics of obesity: towards the understanding of a complex syndrome. **La Presse Médicale**, v. 29, p. 564-571, 2000. In: BOBERG DR. Formas moleculares da butirilcolinesterase e obesidade. 83 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Desnutrição cai e peso das crianças brasileiras ultrapassa padrão internacional. **Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Comunicação Social, Rio de Janeiro, 27 de agosto de 2010.

KELLY, T.; YANG, W.; CHEN, C-S.; REYNOLDS, K.; HE, J. Global burden of obesity in 2005 and projections. **International Journal of Obesity**, v. 32, p.1431-1437, 2008.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y.; NAKAZATO, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, p.656-660, 1999.

---

KORBONITS, M.; GUEORGUIEV, M.; O'GRADY, E.; LECOEUR, C.; SWAN, DC.; MEIN, CA.; WEILL, J.; GROSSMAN, AB.; FROGUEL, P. A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, p. 4005 – 4008, 2002.

KRAUSS, RM.; BLANCHE, PJ.; RAWLINGS, RS.; FERNSTRON, HS.; WILLIAMS, PT. Separate effects of reduced carbohydrate intake and weight loss on atherogenic dyslipidemia. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.83, p.1025–1031, 2006.

LARSEN, LH.; GJESING, AP.; SBRENSSEN, TIA.; HAMID, YH.; ECHWALD, SM.; TOUBRO, S.; BLACK, E.; ASTRUP, A.; HANSEN, T.; PEDERSEN, O. Mutation analysis of the preproghrelin gene: no association with obesity and type 2 diabetes. **Clinical Biochemistry**, v. 38(5), p.420-424, 2005.

LEMIEUX S.; DESPRÉS JP. Metabolic complications of visceral obesity: contribution to the aetiology of type 2 diabetes and implications for prevention and treatment. **Diabetes & Metabolism**, v.20(4), p. 375-393, 1994. *In* CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM NUTRIÇÃO QUÍMICA. **Nutrição na Obesidade**. UNIFESP/EPM, 2006.

LIAO, N.; XIE, ZK.; HUANG, J.; XIE, ZF. Association between the ghrelin Leu72Met polymorphism and type 2 diabetes risk: A meta-analysis. **Gen**, v.517, p.179–183, 2013.

LU S.; GUAN JL.; WANG QP.; UEHARA K.; YAMADA S.; GOTO N.; DATE Y.; NAKAZATOBM.; KOJIMA M.; KANGAWA K.; SHIODA S. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. **Neuroscience Letters**, v.321(3), p.157-160, 2001.

MARQUES-LOPES, I.; MARTI, A.; MORENO-ALIAGA, MJ.; MARTÍNEZ, A. Aspectos Genéticos da Obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 327-338, 2004.

MARTI A.; OCHOA MC.; SÁNCHEZ-VILLEGAS A.; MARTÍNEZ JÁ.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA.; HEBEBRAND J.; HINNEY A.; VEDDER H. Meta-analysis on the effect of the N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor gene (GRL) on human obesity. **BMC Medical Genetics**, v. 7(50), 2006.

NAKAZATO, M.; MURAKAMI, N.; DATE, Y.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K.; MATSUKURA, S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, v. 409, p. 194-198, 2001.

---

National Institutes of Health (NIH) - Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. **Obesity Research**, v. 6, p. 51 – 209, 1998.

MOLL PP.; BURNS TL.; LAUER RM. The genetic and environmental sources of body mass index variability: the Muscatine Ponderosity Family Study. **The American Journal of Human Genetics**, v. 49(6), p.1243-1255, 1991.

RIGBY, N. Eating and Obesity – the new world disorder. **Nutrients**, v. 5, p.4206-4210, 2013.

SMITH, R.G.; van der PLOEG, L.H.; HOWARD, A.D.; FEIGHNER, S.D.; CHENG, K.; HICKEY, G.J.; WYVRATT, M.J.Jr; FISHER, M.H.; NAUNS, R.P.; PATCHETT, A.A.; PeptidomiMic regulation of growth hormone secretion. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 18, p. 621-645, 1997.

SMITH, R.G.; PONG, S.S.; HICKEY, G.; JACKS, T.; CHENG, K.; LEONARD, R.; COHEN, C.J.; ARENA, J.P.; CHANG, C.H.; DRISKO, J.; WYVRATT, M.; FISHER, M.; NAUND, R.; PATCHETT, A. Modulation of pulsatile GH release through a novel receptor in hypothalamus and pituitary gland. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 51, p. 261-285, 1996.

STEINLE NI.; POLLIN TI.; O'CONNELL JR.; MITCHELL BD.; SHULDINER AR. Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the Old Order Amish. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90(12), p. 6672-6677, 2005.

TAKEZAWA J.; YAMADA, K.; MIYACHI, M.; MORITA, A.; AIBA N.; SASAKI S.; WATANABE, S. Preproghrelin gene polymorphisms in obese Japanese women. Minor homozygotes are light eaters, do not prefer protein or fat, and apparently have a poor appetite. **Appetite**, v. 63, p. 105 – 111, 2013.

THOMPSON, PD.; JEFFERY, RW.; WING, RR.; WOOD, PD. Unexpected decrease in plasma high density lipoprotein cholesterol with weight loss. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, p. 2016-2021, 1979.

TSCHÖP M.; SMILEY DL.; HEIMAN ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, v.407, p.908-913, 2000.

---

UCHIDA, A.; ZIGMAN, JM.; PERELLÓ, M. Ghrelin and eating behavior: evidence and insights from genetically-modified mouse models. **Front Neuroscience** v.16, p.121, 2013.

UKKOLA O.; RAVUSSIN E.; JACOBSON P.; SNYDER EE.; CHAGNON M.; SJÖSTRÖM L.; BOUCHARD C. Mutations in the Preproghrelin/Ghrelin Gene associated with obesity in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86(6), p. 3996-3999, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Mean Body Mass Index (BMI). **Global Health Observatory (GHO), Risk Factors**. Disponível em : <[http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/bmi\\_text/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/bmi_text/en/)> Acesso em: 21/10/2013.  
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and Overweight. Fact sheet nº311, 2013.

ZHANG JV.; REN PG.; AVSIAN-KRETCHMER O.; LUO CW.; RAUCH R.; KLEIN C.; HSUEH AJ. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. **Science** v.310(5750), p. 996-999, 2005.

---

---